



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO  
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETÀ INDUSTRIALE  
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

<b>DOMANDA NUMERO</b>	<b>101982900001301</b>
<b>Data Deposito</b>	<b>22/12/1982</b>
<b>Data Pubblicazione</b>	<b>22/06/1984</b>

<b>Priorità</b>	208144/81
<b>Nazione Priorità</b>	JP
<b>Data Deposito Priorità</b>	24-DEC-81

**Titolo**

FORMA y DI CRISTALLI DI BESTATINA E PROCEDIMENTO PER LA LORO PRODUZIONE

---

# DOCUMENTAZIONE RILEGATA

STAMPA

S.I.B.

DESCRIZIONE dell'invenzione industriale dal titolo:

"FORMA  $\gamma$  DI CRISTALLI DI BESTATINA E PROCEDIMENTO

PER LA LORO PRODUZIONE"

a nome della ditta giapponese ZALDAN HOJIN BISEIBUTSU

KAGAKU KENKYUKAI con sede a TOKYO (Giappone)

depositata il 22 DIC. 1982 con No.

**24919A/82**

Inventori: Takashi TERADA, Tetsushi SAINO, Terukatsu

SAKURAI, Hamao UMEZAWA e Masaaki ISHIZUKA

Descrizione modificata

(art. 40 D.P.R. n. 338/1978)

..... istanza dep. il 10.6.1983

### RIASSUNTO

La presente invenzione riguarda una forma  $\gamma$  stabile di cristalli di bestatina. Questi cristalli sono prodotti (a) riscaldando cristalli igroscopici di bestatina e/o un loro idrato ad una temperatura variabile da 148°C al punto di fusione della bestatina, oppure (b) sospendendo cristalli igroscopici di bestatina e/o un loro idrato in uno o più solventi organici scelti dal gruppo costituito da acetone, metiletilchetone, dietiletilchetone, tetraidrofuran, etilacetato, diossano, alcool isopropilico e metanolo acquoso, ovvero impastando i detti cristalli e/o il loro detto idrato con questi solventi.

Uno scopo della presente invenzione è quello di fornire una forma  $\gamma$  cristallina di bestatina,

S.I.B.  
MI

la forma  $\gamma$  cristallina secondo la presente invenzione avendo un modello di diffrazione ai raggi X rappresentato dalla seguente tabella:

$d$ (Å)	$I/I_1$
27.59	0.23
13.80	1.00
6.86	0.08
5.57	0.03
5.47	0.03
5.09	0.02
4.79	0.02
4.55	0.28
4.41	0.03
3.78	0.03
3.43	0.04

Questi cristalli di forma  $\gamma$  possono essere preparati (a) riscaldando cristalli igroscopici di bestatina e/o un loro idrato ad una temperatura variabile da 148°C al punto di fusione della bestatina; oppure (b) sospendendo cristalli igroscopici di bestatina e/o un loro idrato in uno o più solventi scelti dal gruppo costituito da acetone, metil-etyl-chetone, dietil-chetone, tetraidrofurano, etilacetato, diossano, alcool isopropilico e metanolo acquoso ovvero impastando cristalli igroscopici di bestatina

S.I.B.

M.I.

e/o un loro idrato con detti solventi organici.

I cristalli della forma  $\gamma$  secondo la presente invenzione non sono igroscopici, non contengono acqua di cristallizzazione e sono stabili in una misura tale da non subire variazioni di peso per esposizione a condizioni di elevata umidità o per riscaldamento.

Pertanto, i cristalli possono essere maneggiati con estrema facilità nella preparazione di una forma a dosaggio farmaceutico contenente bestatina.

La bestatina ((2S, 3R)-3-ammino-2-idrossi-4-fenilbutanoil-(S)-leucina), è una sostanza estremamente poco tossica isolata da Umezawa et al. dal filtrato di una coltura di Streptomyces olivoreticuli, come inibitore della amminopeptidasi (si veda il brevetto USA No. 4.052.449;; il brevetto giapponese No 7187/1976) ed è un composto che è risultato avere una azione di intensificazione della risposta immunitaria, come una ipersensibilità ritardata, ed attivare il meccanismo di difesa di un organismo vivente, mostrando così un effetto carcinostatico (si veda il brevetto giapponese pubblicato No. 117435/1977), e che presenta una promettente utilità come sostanza farmaceutica.

Quali procedimenti per la produzione di bestatina

S.I.B.  
MI

sono noti un procedimento di fermentazione descritto nel suddetto brevetto USA No. 4052449, un procedimento di sintesi descritto nel brevetto USA No. 4189604 (brevetto giapponese pubblicato 136118/1977), nel brevetto USA No. 4281180 (brevetto giapponese pubblicato No. 79353/1980) ecc., nonchè altri procedimenti

Nel corso delle ricerche per la preparazione di sostanze farmaceutiche contenenti bestatina preparate con il procedimento descritto nell'esempio 19 del suddetto brevetto USA NO. 4281180, il quale si ritiene sia un procedimento industrialmente vantaggioso, la richiedente ha trovato che la bestatina è difficile da maneggiare a causa della sua igroscopicità, ed ha effettuato molteplici studi per migliorare l'aspetto della igroscopicità. Come risultato, si è trovato che l'igroscopicità della bestatina è dovuta alla presenza di cristalli igroscopici di bestatina (indicati nel seguito come cristalli della forma  $\beta$ ), che questi cristalli della forma  $\beta$ , per permanenza all'aria, si trasformano in cristalli biidrati non igroscopici (indicati nel seguito come cristalli della forma  $\alpha$ ) mediante assorbimento d'acqua, e che tanto i cristalli della forma  $\alpha$  quanto i cristalli della forma  $\beta$ , quando sono sospesi od impastati con un solvente specifico, si trasformano in cristalli anidri

S.I.B.  
MI

non igroscopici molto stabili aventi uno specifico modello di diffrazione ai raggi X (i cristalli della presente invenzione, indicati nel seguito come cristalli della forma  $\gamma$ ).

La presente invenzione è stata perfezionata sulla base di questi risultati.

La FIGURA 1 è un modello di diffrazione ai raggi X dei cristalli della forma  $\gamma$  secondo la presente invenzione.

La FIGURA 2 è un termogramma differenziale dei cristalli della forma  $\gamma$  secondo la presente invenzione.

La forma  $\gamma$  dei cristalli della presente invenzione presenta le seguenti proprietà fisico-chimiche:

1. Modello di diffrazione ai raggi X

La tabella 1 e la figura 1 mostrano modelli di diffrazione ai raggi X da polveri, ottenuti in base alla misurazione effettuata impiegando uno strumento di diffrazione ai raggi X Rikagakudenki provvisto di un dispositivo di irraggiamento a Cu munito di un filtro costituito da una lamina di Ni e di un contatore a scintillazione.

TABELLA 1

S.I.B.  
MI

$d(\text{\AA})$	$I/I_1$	$d(\text{\AA})$	$I/I_1$
27.59	0.23	4.79	0.02
13.80	1.00	4.55	0.28
6.86	0.08	4.41	0.03
5.57	0.03	3.78	0.03
5.47	0.03	3.43	0.04
5.09	0.02		

( sorgente elettrica:

Cu; Ni, 30 KV, 20 mA  $\lambda=1.5405$ )

## 2. Analisi termica

In una analisi termica differenziale con uno strumento per analisi termica Shimadzu DT, modello 30, non è stata osservata alcuna reazione esotermica od endotermica fino a circa  $233^\circ\text{C}$ , temperatura alla quale la bestatina fonde e si decomponete. Inoltre nel corso di una analisi termogravimetrica, non è stato osservato alcun cambiamento di peso fino alla decomposizione. In una analisi termogravimetrica, si osserva che i cristalli della forma  $\alpha$  cominciano a perdere peso a circa  $48^\circ\text{C}$  e perdono circa il 9-10% del peso.

## 3. Peso specifico effettivo

S.I.B.  
MI.

Il peso specifico effettivo è 1,173 g/ml quando è misurato con un procedimento a picnometro usando cherosene come mezzo disperdente.

#### 4. Igroscopicità

I cristalli  $\gamma$ , con perdita all'essiccamenento inferiore a 0,5%, sono lasciati riposare nelle seguenti condizioni: temperatura 25°C e 37°C ed umidità relativa 31% ed 83%. In entrambi i casi non sono stati osservati mutamenti di peso. Di conseguenza, i cristalli della forma  $\gamma$  non sono igroscopici. D'altra parte, i cristalli della forma  $\beta$  mostrano incrementi di peso di 8,2% e 9,7% allorchè sono lasciati riposare per 6 ore al 31% e all'82% di umidità relativa.

La forma  $\gamma$  dei cristalli della presente invenzione può essere prodotta con uno dei seguenti procedimenti (a) e (b).

Il procedimento (a) comprende il riscaldamento della forma  $\alpha$  o della forma  $\beta$  dei cristalli ad una temperatura variabile da 148°C al punto di fusione della bestatina, o preferibilmente da 150 a 200°C.

Questa temperatura, 148°C, è quella alla quale i cristalli della forma  $\beta$  si trasformano in cristalli della forma  $\gamma$ . A temperature inferiori a questa, i cristalli della forma  $\gamma$  si trasformano semplicemente

S.I.B.  
MI

nei cristalli  $\beta$  e non possono essere ottenuti i cristalli della forma  $\gamma$ . Inoltre, la bestatina si decomponе purtroppo a temperature superiori al suo proprio punto di fusione.

La durata del riscaldamento è preferibilmente non inferiore ad 1 ora. Se è inferiore, la trasformazione nella forma  $\gamma$  non è completa.

Il procedimento (b) comprende la sospensione dei cristalli della forma  $\alpha$  o della forma  $\beta$  in un solvente organico specifico oppure l'impastamento dei cristalli della forma  $\alpha$  o della forma  $\beta$  con il solvente.

Come solventi organici specifici, possono essere usati metanolo acquoso, preferibilmente metanolo contenente da 6 a 86% (v/v), preferibilmente da 10 a 80% (v/v) di acqua, acetone, metiletilchetone, dietilchitone, tetraidrofurano, etilacetato, diossano o alcool isopropilico. Questi solventi possono essere usati sotto forma di una combinazione di due o più. Tutti i suddetti solventi, ad eccezione del metanolo acquoso, sono preferibilmente privi d'acqua, sebbene essi possano contenere una quantità d'acqua tale da non modificare sostanzialmente la forma cristallina. Ad esempio l'acetone può contenere fino al 20% (v/v) preferibilmente fino al 15% (v/v) d'acqua.

Fra i suddetti solventi si preferisce, dal punto di

S.I.B.  
MI

vista dell'eliminazione dei solventi stessi, un solvente scelto dal gruppo costituito dai solventi a basso punto di ebollizione, come metanolo con basso contenuto d'acqua (ad esempio da 50 a 10% (v/v), acetone e tetraidrofuran, l'acetone essendo il più adatto.

Sebbene la durata della sospensione o dell'impastamento cambi con le condizioni quali la temperatura, essa è ad esempio maggiore di 10 minuti e praticamente compresa fra circa 20 minuti e tre ore.

Inoltre, la temperatura della sospensione o dell'impastamento non è specificata, ma risulta praticamente utile la temperatura ordinaria.

Per quanto riguarda il rapporto del suddetto solvente rispetto ai cristalli della forma  $\alpha$  o della forma  $\beta$ , esso non è indicato se è sufficiente inumidire completamente i cristalli, ed è sufficiente un rapporto ad esempio di 0,3 parti di solvente/una parte di cristalli (p/p).

I cristalli della forma  $\alpha$  usati secondo la presente invenzione possono essere sintetizzati con il procedimento descritto nel suddetto brevetto USA No. 4281180 e possono essere ottenuti mediante un procedimento di precipitazione al punto isoelettrico, comprendente la separazione dei cristalli dalla

S.I.B.  
MI

soluzione acquosa ad un pH da 5 a 6. I cristalli della forma  $\beta$  possono essere ottenuti essiccando i cristalli della forma  $\alpha$  ad una temperatura inferiore a 148°C.

Il procedimento per la produzione dei cristalli della forma  $\beta$  secondo la presente invenzione è descritto concretamente nel seguito con riferimento ad alcuni esempi.

#### ESEMPIO 1

100 g di bestatina (cristalli di forma  $\alpha$ ), ottenuta con un procedimento di precipitazione al punto isoelettrico, sono lasciati in un essiccatore a 150°C per tre ore per ottenere i cristalli della forma  $\gamma$ . La conferma della forma dei cristalli è stata ottenuta con un metodo di diffrazione della polvere ai raggi X.

#### ESEMPIO 2

10 g dei cristalli di forma  $\beta$  ottenuti essicando i cristalli della forma  $\alpha$  usati nell'esempio 1 a 60°C sono sospesi in 100 ml di acetone. La sospensione è agitata per un ora a temperatura ambiente e quindi filtrata. Il panetto ottenuto è seccato sotto pressione ridotta a 30°C per 3 ore. Si ottengono 9,3 g di cristalli della forma  $\gamma$ .

#### ESEMPIO 3

S.I.B.  
MI.

10 g di cristalli di bestatina della forma  $\beta$  sono sospesi in 100 ml di metiletilchetone. La sospensione è agitata per 30 minuti e quindi filtrata.

Il panello ottenuto è stato essiccato in corrente d'aria a 60°C per 5 ore. Si ottengono 7,6 g di cristalli della forma  $\gamma$ .

---

ESEMPIO 4

100 g di cristalli della forma  $\alpha$  sono sospesi in 600 g di dietilchetone. La sospensione è agitata a temperatura ambiente per 20 minuti e quindi centrifugata. Il panello ottenuto è essiccato sotto pressione ridotta a 30°C per 6 ore. Si ottengono 91g di cristalli della forma  $\gamma$ .

ESEMPIO 5

10 g di bestatina (cristalli di forma  $\beta$ ) sono sospesi in 10 g di tetraidrofurano. La sospensione è agitata per 1 ora e quindi filtrata.

Il panello ottenuto è essiccato in corrente d'aria a 60°C per 4 ore. Si ottengono 9,2 g di cristalli della forma  $\gamma$ .

ESEMPIO 6

10 g di bestatina (cristalli della forma  $\beta$ ) sono miscelati ed impastati con 30 ml di diossano in un mortaio per 30 minuti in modo da ottenere una pasta. Questa pasta è essiccata sotto pressione ridotta a

S.I.B.  
MI

60°C per 10 ore. Si ottengono 8,6 g di cristalli della forma  $\gamma$ .

ESEMPIO 7

10 g di bestatina (cristalli di forma  $\beta$ ) sono sospesi in 100 ml di alcool isopropilico, La sospensione è agitata a temperatura ambiente per 20 minuti e quindi filtrata. Il panello ottenuto è seccato sotto pressione ridotta a 60°C per 5 ore. Si ottengono 9,0 g di cristalli della forma  $\gamma$ .

ESEMPIO 8

10 g di bestatina (cristalli della forma  $\beta$ ) sono sospesi in 100 ml di metanolo contenente il 10% di acqua. La sospensione è agitata a temperatura ambiente per 1 ora e quindi filtrata. Il panello ottenuto è essiccato in corrente d'aria a 50°C per 10 ore. Si ottengono 8,1 g di cristalli della forma  $\gamma$ .

ESEMPIO 9

A 100 g di bestatina (cristalli della forma  $\beta$ ) si aggiungono 70 ml di metanolo contenente il 50% di acqua. La miscela è impastata in una piccola impastatrice per 20 minuti. Il prodotto impastato è seccato in corrente d'aria a 50°C per 10 ore. Si ottengono 94 g di cristalli della forma  $\gamma$ .

ESEMPIO 10

10 g di bestatina (cristalli della forma  $\beta$ ) sono

S.I.B.  
MI

sospesi in 100 ml di metanolo contenente l'80% d'acqua.

La sospensione è agitata a temperatura ambiente per 1 ora e quindi filtrata. Il panetto ottenuto è essiccato sotto pressione ridotta a 50°C per 5 ore. Si ottengono 8,9 g di cristalli della forma  $\gamma$ .

RIVENDICAZIONI

1. Cristalli di bestatina della forma  $\gamma$  aventi un modello di diffrazione ai raggi X rappresentato dalla seguente tabella A:

TABELLA A

d (Å)	I/I <sub>1</sub>
27.59	0.23
13.80	1.00
6.86	0.08
5.57	0.03
5.47	0.03
5.09	0.02
4.79	0.02
4.55	0.28
4.41	0.03
3.78	0.03
3.43	0.04

2. Procedimento per la produzione di cristalli di bestatina della forma  $\gamma$ , caratterizzato da (a) riscaldamento di cristalli igroscopici di bestatina

S.I.B.  
MI

e/o di un loro idrato ad una temperatura variabile da 148°C a al punto di fusione della bestatina, oppure da (b) sospensione di cristalli igroscopici di bestatina e/o di un loro idrato in uno o più solventi organici scelti dal gruppo costituito da acetone, metiletilechitone, dietil-chetone, tetraidrofurano, etilacetato, diossano, alcool isopropilico e metanolo acquoso, ovvero dall'impastamento di detti cristalli e/o di detto idrato con i detti solventi organici.

3. Procedimento secondo la rivendicazione 2, in cui il detto riscaldamento è effettuato ad una temperatura compresa fra 150 e 200°C.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 2, in cui il detto solvente è costituito da uno o più solventi scelti dal gruppo costituito da acetone, tetraidrofurano e metanolo acquoso.

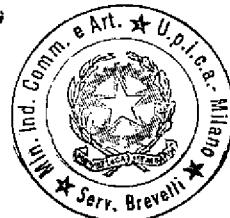
5. Procedimento per la produzione di cristalli di bestatina della forma  $\gamma$ , caratterizzato dalla sospensione di cristalli igroscopici della bestatina e/o di un loro idrato in acetone.

pp. ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU

KAGAKU KENKYUKAI

SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI s.p.a.

Bl-4964 LA/vr



l'Ufficiale Rogante  
(Ivanilla Russo)

S.I.B.  
MI

ALLEGATO A - Rettifiche alla descrizione della domanda  
di brevetto N°24919 A/82 contenute in N°3  
postille, richieste con istanza deposita-  
ta il 10 Giugno 1983

-:-:-:-:-:-:-:-:-:-

Postilla 1 - Pag. 7 riga 25

" $\alpha$ " anzichè " $\gamma$ ";

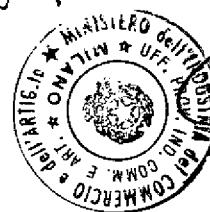
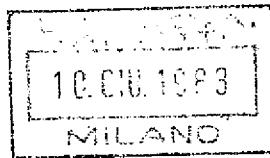
Postilla 2 - Pag. 10 riga 6

" $\gamma$ " anzichè " $\beta$ ";

Postilla 3 - Pag. 11 riga 16

"100 ml" anzichè "10 g".

SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI S.p.A.



## Descrizione

1. Titolo dell'invenzione: Cristalli di bestatina e forme g e procedimenti per la loro produzione

La sospensione è agitata a temperatura ambiente per 1 ora e quindi filtrata. Il anello ottenuto è essiccato sotto pressione ridotta a 50°C per 5 ore. Si ot-

## 2. RIVENDICAZIONI

1. Cristalli di bestatina della forma  $\gamma$  aventi un modello di diffrazione ai raggi X rappresentato dalla seguente tabella A:

TABELLA A

d (Å)	I/I <sub>1</sub>
27.59	0.23
13.80	1.00
6.86	0.08
5.57	0.03
5.47	0.03
5.09	0.02
4.79	0.02
4.55	0.28
4.41	0.03
3.78	0.03
3.43	0.04

2. Procedimento per la produzione di cristalli di bestatina della forma  $\gamma$ , caratterizzato dal riscaldamento di cristalli igroscopici di bestatina

e/o di un loro idrato ad una temperatura variabile

da 148°C ~~o~~ al punto di fusione della bestatina, oppure  
3. Procedimento per la produzione di cristalli di bestatina della forma  $\gamma$ ,  
dalla sospensione di cristalli igroscopici di be- caratterizzato

statina e/o di un loro idrato in uno o più solventi

organici scelti dal gruppo costituito da acetone, metanolo acquoso,

metiletilchitone, dietil-chitone, tetraidrofurano,

etilacetato, diossano e alcool isopropilico e ~~metano-~~

~~lo acquoso~~, ovvero dall'impastamento di detti cristalli

e/o di detto idrato con i detti solventi organici.

3. Procedimento per la rivendicazione 2, in cui il detto riscaldamento è effettuato ad una temperatura compresa fra 150 e 200°C.

4. Procedimento secondo la rivendicazione 2, in cui il detto solvente è costituito da uno o più solventi scelti dal gruppo costituito da acetone, tetraidrofurano e metanolo acquoso.

5. Procedimento per la produzione di cristalli di bestatina della forma  $\gamma$ , caratterizzato dalla sospensione di cristalli igroscopici della bestatina

- 3 -

3 - Descrizione dettagliata dell'invenzione  
Questa invenzione riguarda cristalli di bestatina a forma  $\gamma$  e il procedimento per  
produrla  
~~e/o un loro idrato con detti solventi organici.~~

Però i cristalli della forma  $\gamma$  secondo la presente invenzione non sono igroscopici e non contengono acqua di cristallizzazione, ~~ma non sono solubili in acqua~~  
~~ma non subiscono variazioni di peso~~

~~Peraltro~~, i cristalli possono essere maneggiati con estrema facilità nella preparazione di una forma a dosaggio farmaceutico contenente bestatina.

La bestatina ((2S, 3R)-3-ammino-2-idrossi-4-fenilbutanoil-(S)-leucina), è una sostanza estremamente poco tossica isolata da Umezawa et al. dal filtrato di una coltura di Streptomyces olivoreticuli, come inibitore della amminopeptidasi (si veda il brevetto a disposizione per le consultazioni pubbliche USA No. 4.052.449; il brevetto giapponese No 7187/1976) ed è un composto che è risultato avere una azione di intensificazione della risposta immunitaria, come una ipersensibilità ritardata, ed attivare il meccanismo di difesa di un organismo vivente, mostrando così un effetto carcinostatico (si veda il brevetto a disposizione per le consultazioni pubbliche giapponese pubblicato No. 117435/1977), e che presenta una promettente utilità come sostanza farmaceutica.

Quali procedimenti per la produzione di bestatina

sono noti un procedimento di fermentazione descritto  
~~gi apponese a disposizione pubblica N. 7187/1976,~~  
nel suddetto brevetto USA No. 4052449, un procedi-  
mento di sintesi descritto nel ~~brevetto USA No. 4189604~~  
~~a disposizione per le consultazioni~~  
~~brevetto giapponese pubblicato 136118/1977), nel~~  
~~brevetto USA No. 4281180 (brevetto giapponese pubbli-~~  
~~ca No. 79353/1980) ecc., nonchè altri procedimenti~~

Nel corso delle ricerche per la preparazione di sostanze farmaceutiche contenenti bestatina preparata con il procedimento descritto nell'esempio ~~1~~ del ~~giapponese n. 79353/1980 a disposizione per le consultazioni pubbliche~~ suddetto brevetto USA No. 4281180, il quale si ritiene sia un procedimento industrialmente vantaggioso, ~~gli autori della presente invenzione hanno~~, <sup>1</sup> ~~richiedente ha~~ trovato che la bestatina è difficile da maneggiare a causa della sua igroscopicità, ed ~~hanno~~ ha effettuato molteplici studi per migliorare l' ~~aspetto della igroscopicità~~. Come risultato, si è trovato che l'igroscopicità della bestatina è dovuta alla presenza di cristalli igroscopici di bestatina (indicati nel seguito come cristalli della forma  $\beta$ ), che questi cristalli della forma  $\beta$ , per permanenza all'aria, si trasformano in cristalli biidrati non igroscopici (indicati nel seguito come cristalli della forma  $\alpha$ ) mediante assorbimento d'acqua, e che tanto i cristalli della forma  $\alpha$  quanto i cristalli della ~~riscaldati al di sopra di una certa temperatura e~~ forma  $\beta$ , quando sono sospesi od impastati con un solvente specifico, si trasformano in cristalli anidri

non igroscòpici molto stabili aventi uno specifico modello di diffrazione ai raggi X (i cristalli della presente invenzione, indicati nel seguito come cristalli della forma  $\gamma$ ).

La presente invenzione è stata perfezionata sulla base di questi risultati.

~~La FIGURA 1 è un modello di diffrazione ai raggi X dei cristalli della forma  $\gamma$  secondo la presente invenzione.~~

~~La FIGURA 2 è un termogramma differenziale dei cristalli della forma  $\gamma$  secondo la presente invenzione.~~

La forma  $\gamma$  dei cristalli della presente invenzione presenta le seguenti proprietà fisico-chimiche:

1. Modello di diffrazione ai raggi X

La tabella 1 e la figura 1 mostrano modelli di diffrazione ai raggi X da polveri, ottenuti in base alla misurazione effettuata impiegando uno strumento di diffrazione ai raggi X Rikagakudenki provvisto di un dispositivo di irraggiamento a Cu munito di un filtro costituito da una lamina di Ni e di un contatore a scintillazione.

TABELLA 1

$d(\text{\AA})$	$I/I_1$	$d(\text{\AA})$	$I/I_1$
27.59	0.23	4.79	0.02
13.80	1.00	4.55	0.28
6.86	0.08	4.41	0.03
5.57	0.03	3.78	0.03
5.47	0.03	3.43	0.04
5.09	0.02		

(sorgente elettrica:

Cu; Ni, 30 KV, 20 mA  $\lambda=1.5405$ )

## 2. Analisi termica

In una analisi termica differenziale con uno strumento per analisi termica Shimadzu DT, modello 30, non è stata osservata alcuna reazione esotermica od endotermica fino a circa  $233^{\circ}\text{C}$ , temperatura alla quale la bestatina fonde e si decomponete. Inoltre nel corso di una analisi termogravimetrica, non è stato osservato alcun cambiamento di peso fino alla decomposizione. ~~La decomposizione~~ ~~comincia~~ ~~verso~~ ~~la~~ ~~fine~~ ~~del~~ ~~range~~ ~~di~~ ~~temperatura~~ ~~che~~ ~~è~~ ~~intorno~~ ~~a~~ ~~233^{\circ}\text{C}~~ ~~è~~ ~~perdono~~ ~~circa~~ ~~10%~~

## 3. Peso specifico effettivo

Il 'peso' specifico effettivo è 1,173 g/ml quando è misurato con un procedimento a picnometro usando cherosene come mezzo disperdente.

#### 4. Igroscopicità

I cristalli  $\gamma$ , con perdita all'essiccamiento inferiore a 0,5%, sono lasciati riposare nelle seguenti condizioni: temperatura 25°C e 37°C ed umidità relativa 31% ed 83%. In entrambi i casi non sono stati osservati mutamenti di peso. Di conseguenza, i cristalli della forma  $\gamma$  non sono igroscopici. ~~Due~~

~~Le analisi della forma  $\gamma$  mostrano che i cristalli di peso di 8,2%~~

~~9,7%~~ allorchè sono lasciati

~~per 24 ore di 25°C e di 82% di umidità relativa~~

~~lasciati~~

La forma  $\gamma$  dei cristalli della presente invenzione può essere prodotta con uno dei seguenti <sup>due</sup> procedimenti.

~~(a) e (b).~~

~~Il~~ <sup>primo</sup> procedimento ~~(a)~~ comprende il riscaldamento della forma  $\alpha$  o della forma  $\beta$  dei cristalli ad una temperatura variabile da 148°C al punto di fusione della bestatina, ~~è~~ preferibilmente da 150 a 200°C.

Questa temperatura, 148°C, è quella alla quale i cristalli della forma  $\beta$  si trasformano in cristalli della forma  $\gamma$ . A temperature inferiori a questa, i cristalli della forma  $\alpha$   <sup>$\alpha$</sup>  si trasformano semplicemente

nei cristalli  $\beta$  e non possono essere ottenuti i cristalli della forma  $\gamma$ . Inoltre, la bestatina si decomponne purtroppo a temperature superiori al suo proprio punto di fusione.

La durata del riscaldamento è preferibilmente non inferiore ad 1 ora. Se è inferiore, la trasformazione nella forma  $\gamma$  non è completa.

*Secondo*  
Il procedimento ~~2~~ comprende la sospensione dei cristalli della forma  $\alpha$  o della forma  $\beta$  in un solvente organico specifico oppure l'impastamento dei cristalli della forma  $\alpha$  o della forma  $\beta$  con il solvente.

Come solventi organici specifici, possono essere usati metanolo acquoso, ~~preferibilmente metanolo~~ contenente da ~~6 a 86% (v/v)~~, preferibilmente da 10 a 80% ~~(v/v)~~ di acqua, acetone, metiletilchetone, dietilchetone, tetraidrofurano, etilacetato, diossano o alcool isopropilico. Questi solventi possono essere usati sotto forma di una combinazione di due o più. ~~Per~~

~~Le soluzioni acquose del metanolo~~  
sono preferibilmente privi d'acqua, sebbene essi possano contenere una quantità d'acqua tale da non modificare sostanzialmente la forma cristallina. Ad esempio l'acetone può contenere fino al 20% (v/v) preferibilmente fino al 15% (v/v) d'acqua.

~~fra i suddetti solventi si preferisce il vanto di~~

vente scelto dal gruppo costituito da solventi a basso punto di ebollizione, come metanolo con basso contenuto d'acqua (ad esempio da 50 a 10% (v/v), ace-

Sebbene la durata della sospensione o dell'impastamento cambi con le condizioni quali la temperatura, essa è ad esempio maggiore di 10 minuti e praticamente compresa fra circa 20 minuti e tre ore.

Inoltre, la temperatura della sospensione o dell'impastamento non è specificata, ma risulta praticamente utile la temperatura ordinaria.

Per quanto riguarda il rapporto del suddetto solvente rispetto ai cristalli della forma  $\alpha$  o della forma  $\beta$ , esso non è indicato se è sufficiente inumidire completamente i cristalli, ed è sufficiente un rapporto ad esempio di 0,3 parti di solvente/una parte di cristalli (p/p).

I cristalli della forma  $\alpha$  usati secondo la presente invenzione possono essere sintetizzati con il procedimento descritto nel suddetto brevetto giapponese N° 79353/1980 a disposizione per la consultazione pubblica USA N° 4281180 e possono essere ottenuti mediante un procedimento di precipitazione al punto isoelettrico, comprendente la separazione dei cristalli dalla

soluzione acquosa ad un pH da 5 a 6. I cristalli della forma  $\beta$  possono essere ottenuti essiccando i cristalli della forma  $\alpha$  ad una temperatura inferiore a 148°C.

Il procedimento per la produzione dei cristalli della forma  $\gamma$  secondo la presente invenzione è descritto concretamente nel seguito con riferimento ad alcuni esempi.

ESEMPIO 1

100 g di bestaina (cristalli di forma  $\alpha$ ), ottenuta con un procedimento di precipitazione al punto isoelettrico, sono lasciati in un essiccatore a 150°C per tre ore per ottenere i cristalli della forma  $\gamma$ . La conferma della forma dei cristalli è stata ottenuta con un metodo di diffrazione della polvere ai raggi X.

ESEMPIO 2

10 g dei cristalli di forma  $\beta$  ottenuti essiccando i cristalli della forma  $\alpha$  usati nell'esempio 1 a 60°C sono sospesi in 100 ml di acetone. La sospensione è agitata per un ora a temperatura ambiente e quindi filtrata. Il panetto ottenuto è seccato sotto pressione ridotta a 30°C per 3 ore. Si ottengono 9,3 g di cristalli della forma  $\gamma$ .

ESEMPIO 3

10 g di cristalli di bestatina ~~della~~ <sup>(cristalli di)</sup> ~~(forma β)~~ sono sospesi in 100 ml di metiletilchetone. La sospensione è agitata per 30 minuti e quindi filtrata. Il panetto ottenuto è stato essiccato in corrente d'aria a 60°C per 5 ore. Si ottengono 7,6 g di cristalli della forma γ.

ESEMPIO 4

100 g di cristalli della forma α sono ~~—~~ sospesi in 600 g di dietilchetone. La sospensione è agitata a temperatura ambiente per 20 minuti e quindi centrifugata. Il panetto ottenuto è essiccato sotto pressione ridotta a 30°C per 6 ore. Si ottengono 91 g di cristalli della forma γ.

ESEMPIO 5

10 g di bestatina (cristalli di forma β) sono sospesi in ~~20 ml~~ <sup>100 ml</sup> di tetraidrofurano. La sospensione è agitata per 1 ora e quindi filtrata.

Il panetto ottenuto è essiccato in corrente d'aria a 60°C per 4 ore. Si ottengono 9,2 g di cristalli della forma γ.

ESEMPIO 6

10 g di bestatina (cristalli della forma β) sono miscelati ed impastati con 30 ml di diossano in un mortaio per 30 minuti in modo da ottenere una pasta. Questa pasta è essiccata sotto pressione ridotta a

60°C per 10 ore. Si ottengono 8,6 g di cristalli della forma  $\gamma$ .

ESEMPIO 7

10 g di bestatina (cristalli di forma  $\beta$ ) sono sospesi in 100 ml di alcool isopropilico. La sospensione è agitata a temperatura ambiente per 20 minuti e quindi filtrata. Il panello ottenuto è seccato sotto pressione ridotta a 60°C per 5 ore. Si ottengono 9,0 g di cristalli della forma  $\gamma$ .

ESEMPIO 8

10 g di bestatina (cristalli della forma  $\beta$ ) sono sospesi in 100 ml di metanolo contenente il 10% di acqua. La sospensione è agitata a temperatura ambiente per 1 ora e quindi filtrata. Il panello ottenuto è essiccato in corrente d'aria a 50°C per 10 ore. Si ottengono 8,1 g di cristalli della forma  $\gamma$ .

ESEMPIO 9

A 100 g di bestatina (cristalli della forma  $\beta$ ) si aggiungono 70 ml di metanolo contenente il 50% di acqua. La miscela è impastata in una piccola impastatrice per 20 minuti. Il prodotto impastato è seccato in corrente d'aria a 50°C per 10 ore. Si ottengono 94 g di cristalli della forma  $\gamma$ .

ESEMPIO 10

10 g di bestatina (cristalli della forma  $\beta$ ) sono

sospesi in 100 ml di metanolo contenente l'80% d'acqua.

La sospensione è agitata a temperatura ambiente per 1 ora e quindi filtrata. Il panetto ottenuto è essiccato sotto pressione ridotta a 50°C per 5 ore. Si ottengono 8,9 g di cristalli della forma γ.

4. Breve descrizione dei disegni:

La Figura 1 è un modello di diffrazione ai raggi X di cristalli della forma γ della presente invenzione.

La Fig. 2 è un termogramma differenziale di cristalli della forma γ della presente invenzione.

(Per Traduzione Conforme)

SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI S.p.A.





Al Ministero dell'Industria, Commercio e Artigianato

- Ufficio Centrale Brevetti -

05644

- ROMA -

Oggetto: Dom. di brevetto per invenzione industriale

N°24919 A/82 del 22 Dicembre 1982 a nome

ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYUKAI

Con la presente si fa istanza affinchè code  
sto Spett/le Ufficio voglia concedere di apportare,  
al testo della domanda di brevetto in oggetto, le se-  
guenti correzioni o modifiche secondo l'Art.49,D.P.R.

del 22 Giugno 1979 N°338

Pag. 7 riga 25 - "α" anzichè "γ";

" 10 " 6 - "γ" anzichè "β";

" 11 " 16 - "100 ml" anzichè "10 g";

Si allegano:

-) 2 copie delle pagine con i rinvii al-  
le postille;

-) 2 copie delle postille numerate;

-) 1 copia delle pagine con le rettifiche  
incorporate.

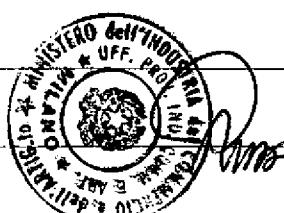
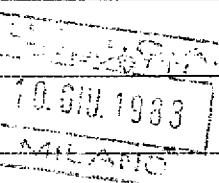
Confidando in un benevolo accoglimento del-  
la presente istanza, si ringrazia anticipatamente e  
si porgono distinti saluti.

Milano, 10 GIU. 1983

pp. ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYUKAI

SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI s.p.a.

*J. M. M.*



Il peso specifico effettivo è 1,173 g/ml quando è misurato con un procedimento a picnometro usando cherosene come mezzo disperdente.

#### 4. Igroscopicità

I cristalli  $\gamma$ , con perdita all'essiccamento inferiore a 0,5%, sono lasciati riposare nelle seguenti condizioni: temperatura 25°C e 37°C ed umidità relativa 31% ed 83%. In entrambi i casi non sono stati osservati mutamenti di peso. Di conseguenza, i cristalli della forma  $\gamma$  non sono igroscopici. D'altra parte, i cristalli della forma  $\beta$  mostrano incrementi di peso di 8,2% e 9,7% allorchè sono lasciati riposare per 6 ore al 31% e all'82% di umidità relativa.

La forma  $\gamma$  dei cristalli della presente invenzione può essere prodotta con uno dei seguenti procedimenti (a) e (b).

Il procedimento (a) comprende il riscaldamento della forma  $\alpha$  o della forma  $\beta$  dei cristalli ad una temperatura variabile da 148°C al punto di fusione della bestatina, o preferibilmente da 150 a 200°C. Questa temperatura, 148°C, è quella alla quale i cristalli della forma  $\beta$  si trasformano in cristalli della forma  $\gamma$ . A temperature inferiori a questa, i cristalli della forma  $\beta$  si trasformano semplicemente (Postilla 1).

Vedere

(Postilla 1)

soluzione acquosa ad un pH da 5 a 6. I cristalli della forma  $\beta$  possono essere ottenuti essiccando i cristalli della forma  $\alpha$  ad una temperatura inferiore a 148°C.

Il procedimento per la produzione dei cristalli della forma  $\beta$  secondo la presente invenzione è descritto concretamente nel seguito con riferimento ad alcuni esempi.

#### ESEMPIO 1

100 g di bestatina (cristalli di forma  $\alpha$ ), ottenuta con un procedimento di precipitazione al punto isoelettrico, sono lasciati in un essiccatore a 150°C per tre ore per ottenere i cristalli della forma  $\gamma$ . La conferma della forma dei cristalli è stata ottenuta con un metodo di diffrazione della polvere ai raggi X.

#### ESEMPIO 2

10 g dei cristalli di forma  $\beta$  ottenuti essicando i cristalli della forma  $\alpha$  usati nell'esempio 1 a 60°C sono sospesi in 100 ml di acetone. La sospensione è agitata per un ora a temperatura ambiente e quindi filtrata. Il panetto ottenuto è seccato sotto pressione ridotta a 30°C per 3 ore. Si ottengono 9,3 g di cristalli della forma  $\gamma$ .

#### ESEMPIO 3

Vedere  
(Postilla 2)

10 g di cristalli di bestatina della forma  $\beta$  sono sospesi in 100 ml di metiletilchetone. La sospensione è agitata per 30 minuti e quindi filtrata. Il panetto ottenuto è stato essiccato in corrente d'aria a 60°C per 5 ore. Si ottengono 7,6 g di cristalli della forma  $\gamma$ .

ESEMPIO 4

100 g di cristalli della forma  $\alpha$  sono sospesi in 600 g di dietilchetone. La sospensione è agitata a temperatura ambiente per 20 minuti e quindi centrifugata. Il panetto ottenuto è essiccato sotto pressione ridotta a 30°C per 6 ore. Si ottengono 91 g di cristalli della forma  $\gamma$ .

ESEMPIO 5

10 g di bestatina (cristalli di forma  $\beta$ ) sono sospesi in 10 g di tetraidrofurano. La sospensione è agitata per 1 ora e quindi filtrata.

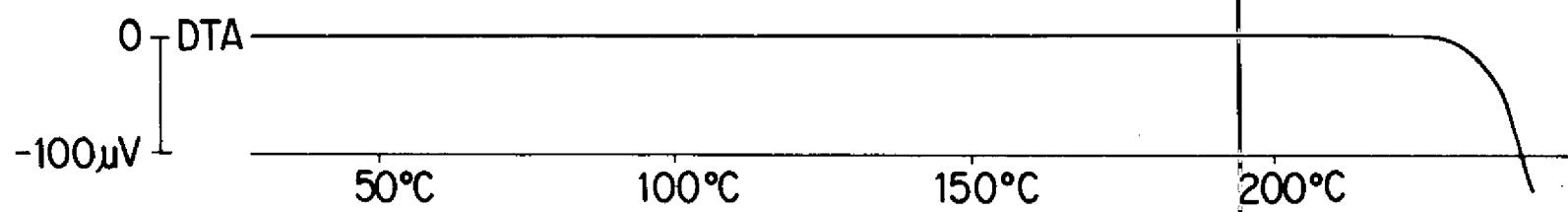
Il panetto ottenuto è essiccato in corrente d'aria a 60°C per 4 ore. Si ottengono 9,2 g di cristalli della forma  $\gamma$ .

Vedere  
(Postilla 3)

ESEMPIO 6

10 g di bestatina (cristalli della forma  $\beta$ ) sono miscelati ed impastati con 30 ml di diossano in un mortaio per 30 minuti in modo da ottenere una pasta. Questa pasta è essiccata sotto pressione ridotta a

Fig. 2

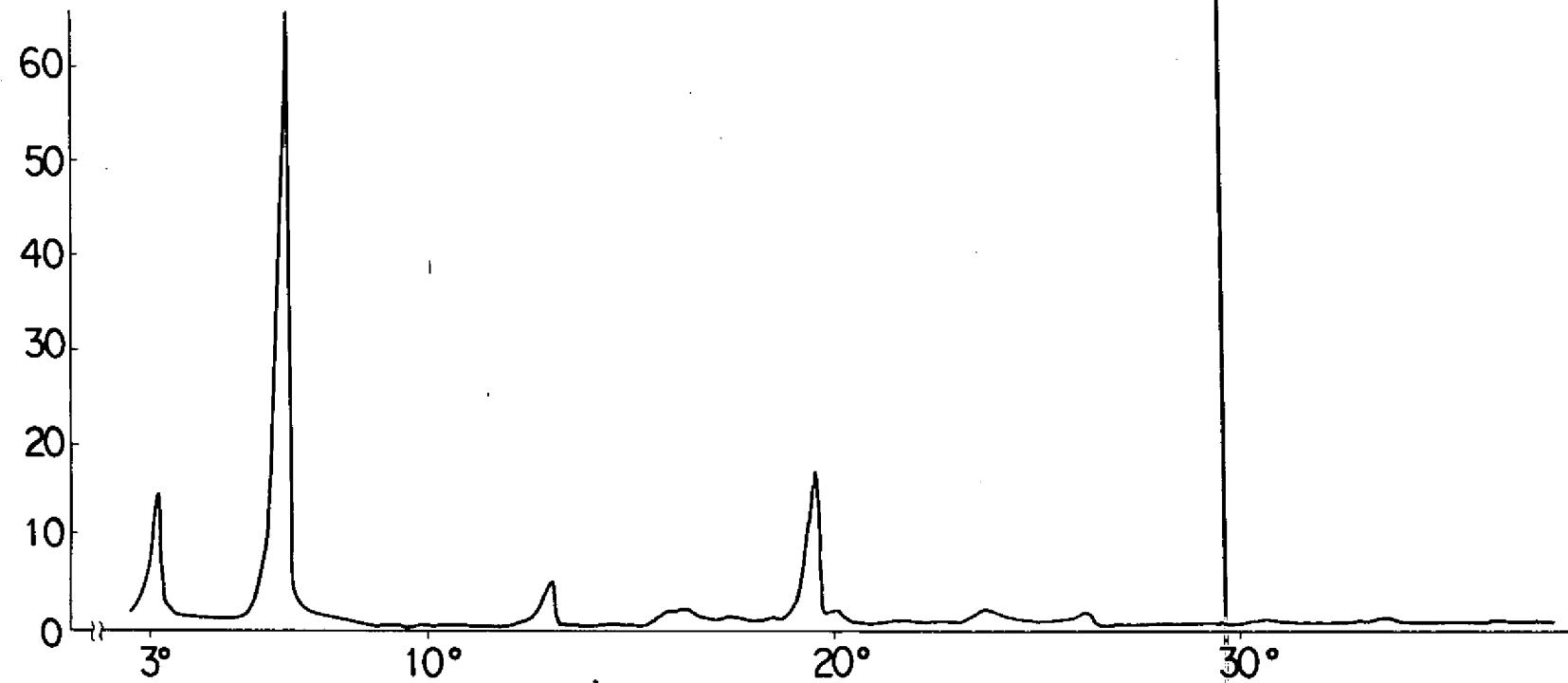


24/9/94/92



l'Ufficiale Reggente  
(ditta Russo)  
P. Russo

Fig. 1



I'Ufficiale Rogante  
(Willie Russo)  
Serr. Brevetti

SOCIETÀ ITALIANA BREVETTI s.p.a.

249194/82